

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
16 de Mayo de 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 02/38152 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 31/28,
31/13, A61P 3/10

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES01/00424

(22) Fecha de presentación internacional:
6 de Noviembre de 2001 (06.11.2001)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200002745
7 de Noviembre de 2000 (07.11.2000) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
UNIVERSIDAD DE BARCELONA [ES/ES]; Centre de
Patents, Baldiri Reixac, 4, E-08028 Barcelona (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
ZORZANO OLARTE, Antonio [ES/ES]; Centre de
Patents, Universidad de Barcelona, Baldiri Reixac 4,
E-08028 Barcelona (ES). CARPENE, Christian [FR/ES];
Centre de Patents, Universidad de Barcelona, Baldiri
Reixac 4, E-08028 Barcelona (ES). ENRIQUE-TARAN-
CON DELMAS, Gemma [ES/ES]; Centre de Patents,
Universidad de Barcelona, Baldiri Reixac 4, E-08028

Barcelona (ES). MARTI, Luc [FR/ES]; Centre de Patents,
Universidad de Barcelona, Baldiri Reixac 4, E-08028
Barcelona (ES). TESTAR YMBERT, Xavier [ES/ES];
Centre de Patents, Universidad de Barcelona, Baldiri
Reixac 4, E-08028 Barcelona (ES). PALACIN PRIETO,
Manuel [ES/ES]; Centre de Patents, Universidad de
Barcelona, Baldiri Reixac 4, E-08028 Barcelona (ES).
ABELLA MARTI, Anna [ES/ES]; Centre de Patents,
Universidad de Barcelona, Baldiri Reixac 4, E-08028
Barcelona (ES).

(74) Mandatario: SEGURA CAMARA, Pascual; Centre de
Patents, Baldiri Reixac, 4, E-08028 Barcelona (ES).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: COMBINATION OF AMINES AND VANADIUM (IV)/(V) COMPOUNDS FOR THE TREATMENT AND/OR PRE-
VENTION OF DIABETES MELLITUS

(54) Título: COMBINACION DE AMINAS Y COMPUESTOS DE VANADIO (IV)/(V) PARA EL TRATAMIENTO Y/O LA
PREVENCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS

(57) Abstract: Combinations including vanadium (IV)/(V) compounds and pharmaceutically acceptable amines selected from amongst the group of semicarbazide-sensitive amine oxidase substrates (SSAO) are imitators of insulin. The preferred vanadium (IV)/(V) compounds are vanadyl salts, vanadyl complexes and vanadates (for example, sodium orthovanadate). The preferred amines are tyramine and benzylamine. As a result of a synergy between the vanadium compound and the amine disclosed herein, an effective concentration of vanadate in said combination is lower than the one corresponding to vanadate alone. Consequently, the combination has a much lower toxicity than the vanadium compound alone, as is already known, which provides a crucial advantage of the combination for its use in the treatment and/or prevention of Diabetes mellitus.

(57) Resumen: Las combinaciones que incluyen compuestos de vanadio (IV)/(V) y aminas farmacéuticamente aceptables seleccionadas del grupo de los sustratos de la amino oxidasa sensible a semicarbazida (SSAO) son imitadores de la insulina. Los compuestos de vanadio (IV)/(V) preferidos son las sales de vanadilo, los complejos de vanadilo y los vanadatos (p.ej., el ortovanadato sódico). Las aminas preferidas son la tiramina y la bencilamina. Una sinergia entre el compuesto de vanadio y la amina, descubierta aquí, hace que la concentración eficaz de vanadato en la combinación sea un orden de magnitud menor que la correspondiente al vanadato solo. Consecuentemente, la combinación tiene una toxicidad mucho menor que la del compuesto vanadio solo, ya conocido, lo cual representa una ventaja crucial de la primera para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la Diabetes mellitus.

WO 02/38152 A1



Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional*

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

Combinación de aminos y compuestos de vanadio (IV)/(V)
para el tratamiento y/o la prevención de la Diabetes
mellitus

- 5 Esta invención se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen una combinación de ciertas aminos y de compuestos de vanadio (IV)/(V) farmacéuticamente aceptables, para su uso como imitadores de la insulina, o sea, para combatir la enfermedad Diabetes mellitus.

10

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- La Diabetes mellitus es uno de los principales problemas de salud a escala mundial, que según la Organización
15 Mundial de la Salud está alcanzando proporciones epidémicas. En la actualidad es la cuarta causa de muerte en la mayoría de países desarrollados, y es una enfermedad que crece rápidamente en los países en vías de industrialización. La Diabetes mellitus es una enfermedad
20 causada por un metabolismo defectuoso de los carbohidratos y caracterizada por cantidades anormalmente altas del azúcar glucosa en la sangre y la orina. La Diabetes mellitus puede eventualmente dañar los ojos, los riñones, el corazón y los miembros, y puede poner en
25 peligro el embarazo.

- Normalmente la Diabetes mellitus se clasifica en dos tipos. El Tipo 1, o Diabetes mellitus insulino-dependiente, antes llamada diabetes juvenil, que se da en
30 niños y jóvenes, se ha considerado como una enfermedad autoinmune. Es rápida en su ataque y en su progreso, y corresponde aproximadamente a un 10-15 % de todos los casos. La de Tipo 2, o Diabetes mellitus no-insulino-dependiente, antes llamada diabetes del adulto,
35 normalmente se da en personas de más de 40 años y progresa lentamente. La de Tipo 2, que con mucho es la más frecuente, a menudo no se acompaña por cuadros

clínicos en sus estados iniciales, sino que se detecta por elevados niveles de glucosa en sangre u orina.

Se considera que la diabetes es un grupo de desórdenes con múltiples causas, más que un único desorden. El páncreas humano secreta una hormona llamada insulina que facilita la entrada del azúcar glucosa en los tejidos del cuerpo, así como su utilización, proporcionando energía para las actividades del cuerpo. Sin embargo, en una persona con diabetes la entrada de glucosa está dificultada, lo cual es un resultado de, bien una deficiencia en la cantidad de insulina producida, bien una alteración en las células diana. Consecuentemente, el azúcar se acumula en la sangre y se excreta por la orina. En el diabético de Tipo 1 el problema es casi siempre una reducción severa o total en la producción de insulina. En el diabético de Tipo 2, frecuentemente el páncreas produce una considerable cantidad de insulina, pero la hormona es incapaz de promover la utilización de la glucosa por los tejidos. De hecho, una característica central de la diabetes de Tipo 2 es la existencia de resistencia a la insulina. El proporcionar nuevos imitadores de insulina para el tratamiento y/o la prevención de la diabetes es un problema terapéutico, y este problema es especialmente importante en relación con el tipo más frecuente de la enfermedad, o sea, con la diabetes de Tipo 2.

La amino oxidasa sensible a semicarbazida ("Semicarbazide-sensitive amina oxidase" en inglés, abreviado SSAO) abarca un grupo de enzimas que muestra una amplia distribución en los tejidos de los mamíferos, pero cuya función biológica no se conoce. Hasta la fecha, los sustratos de la amino oxidasa sensible a semicarbazida nunca se han propuesto para el tratamiento de la Diabetes mellitus, ni solos ni en combinación con otros agentes. De hecho, la amino oxidasa sensible a semicarbazida nunca

se ha asociado con actividad imitadora de la insulina.

En los últimos años se han descrito varios compuestos inorgánicos que imitan los efectos de la insulina, tanto
5 in vivo como en células aisladas y tejidos. Tales compuestos incluyen compuestos de vanadio (IV)/(V) (cf. Heyliger y col., "Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats", Science 1985, vol. 227, pp. 1474-7); selenate (cf.
10 McNeill y col., "Insulinlike effects of sodium selenate in streptozotocin-induced diabetic rats", Diabetes 1991, vol. 40, pp. 1675-8), lithium salts (cf. Rodríguez-Gil y col., "Lithium restores glycogen synthesis of glucose in hepatocytes of diabetic rats", Arch. Biochem. Biophys.
15 1993, vol. 301, pp. 411-5), y compuestos de tungsteno (VI) (cf. US 5.595.763). Inventores de la presente invención han mostrado que algunas combinaciones de bencilamina o tiramina (dos sustratos SSAO) y bajas concentraciones de vanadato estimulan el transporte de
20 glucosa en adipocitos de rata (cf. G. Enrique-Tarancon et al., Biochem. J. 2000, vol. 350, pp. 171-180). Pero no hay nada en el estado de la técnica que sugiera una actividad similar en el músculo y las células beta-pancreáticas de pacientes diabéticos, o sea, que sugiera
25 el uso de dichas combinaciones contra la Diabetes.

Entre los derivados de vanadio que han sido estudiados como imitadores de la insulina están los siguientes: los vanadatos y los complejos de peroxovanadio (vanadio en su
30 estado de oxidación +5 combinado con oxígeno; especialmente el ortovanadato VO_4^{3-} , cf. US 4.882.171), y las sales y complejos de vanadilo VO^{2+} (vanadio en su estado de oxidación +4 ; cf. US 5.300.496).

35 Algunos compuestos de vanadio se están ensayando clínicamente en Europa y América. Pero la administración de compuestos de vanadio tiene el inconveniente de su

toxicidad a dosis eficaces. Las concentraciones administradas han de ser próximas al nivel tóxico, si se quiere alcanzar efectos imitadores de la insulina en animales. El tratamiento con vanadio viene acompañado
5 siempre de graves efectos secundarios que son independientes de la forma química de vanadio que se use (cf. Domingo y col., "Oral vanadium administration to streptozocin-diabetic rats has marked negative side-effects wich are independent from the form of vanadium
10 used", Toxicology 1991, vol. 66, pp. 279-87.). Se observan importantes signos de toxicidad de compuestos de vanadio a todas las dosis que son capaces de bajar la glucosa en sangre, incluso una tasa de mortalidad significativa. Por lo tanto, un importante problema de la
15 terapia y/o la prevención de la Diabetes mellitus es conseguir una reducción sustancial en las dosis de compuestos de vanadio, manteniendo su actividad imitadora de la insulina.

20 EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Esta invención resuelve el problema antes mencionado al proporcionar una nueva combinación farmacéutica que incluye un compuesto de vanadio (IV)/(V)
25 farmacéuticamente aceptable y una amina farmacéuticamente aceptable seleccionada del grupo de los sustratos de la amino oxidasa sensible a semicarbazida, mezclados con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha combinación es útil para el tratamiento y/o la
30 prevención de la Diabetes mellitus en mamíferos, particularmente en humanos. Dependiendo de las circunstancias, a determinar en cada caso mediante los usuales ensayos farmacológicos y clínicos, los ingredientes activos de la combinación pueden
35 administrarse simultáneamente, separadamente o secuencialmente. Aunque la administración parenteral es posible, la oral es preferida.

En el contexto de esta invención, el término "un compuesto de vanadio (IV)/(V) farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier entidad química formada por uno o varios átomos de vanadio en sus estados de oxidación +4 o +5, unida a una estructura química que es farmacéuticamente aceptable por sí misma. Los cationes V^{4+} y V^{5+} nunca se han observado aislados, y siempre están acompañados de una estructura química parcialmente formada por una esfera de coordinación. La esfera de coordinación puede estar formada por ligandos inorgánicos (óxido, hidróxido, peróxido, etc) como, por ejemplo, en el caso del anión ortovanadato VO_4^{3-} (vanadio +5 y una esfera de coordinación formada por cuatro iones óxido), y en el caso del catión vanadilo VO^{2+} (vanadio +4 y una esfera de coordinación formada por un ion óxido). La esfera de coordinación puede estar formada también por ligandos orgánicos (moléculas o iones unidos a los átomos de vanadio a través de átomos de O, S o N), pertenecientes a diferentes compuestos orgánicos farmacéuticamente aceptables (p.ej. alcoholes, tioles, ácidos carboxílicos, aminas, aminoácidos, heterociclos nitrogenados, etc., todos farmacéuticamente aceptables). También son posibles las esferas de coordinación mixtas como, por ejemplo, en los iones complejos peroxovanadio $[VO(O_2)_2L-L']^{n-}$, siendo L-L' un ligando orgánico bidentado tal como la 1,10-fenantrolina. Cuando la estructura formada por el átomo de vanadio y su esfera de coordinación no es neutra, el término "estructura química" también incluye a cualquier especie iónica farmacéuticamente aceptable que hace neutro al compuesto en su totalidad. Por ejemplo, los aniones vanadato siempre vienen acompañados de cationes (p.ej. sodio, potasio, magnesio, calcio), formando sales neutras. El término "compuesto de vanadio (IV)/(V) farmacéuticamente aceptable" también incluye a cualquier solvato (p.ej. hidrato) farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto".

El término "amino oxidasa sensible a semicarbazida" (en inglés, "semicarbazide-sensitive amina oxidase", SSAO) significa cualquier enzima presente en tejidos de mamíferos que es capaz de oxidar una amplia variedad de aminas con la producción concomitante de peróxido de hidrógeno, y que es inhibida por la semicarbazida. Junto a unos pocos ejemplos de aminas secundarias, la mayoría de los sustratos de amino oxidasa sensible a semicarbazida son aminas primarias, tales como: tiramina, bencilamina, desoxiepinefrina, epinefrina, norepinefrina, dopamina, histamina, β -feniletilamina, N-acetilputrescina, triptamina, n-octilamina, n-pentilamina, quinuramina, 3-metoxitiramina, y n-decilamina.

En una realización preferida, la combinación farmacéutica incluye un compuesto de vanadio seleccionado del grupo formado por vanadatos, complejos de peroxovanadio, sales de vanadilo y complejos de vanadilo. Son especialmente preferidos las que incluyen un vanadato, y más preferidas las que incluyen ortovanadato sódico Na_3VO_4 .

En otra realización preferida, la composición farmacéutica contiene una amina seleccionada del grupo formado por tiramina, bencilamina, desoxiepinefrina, epinefrina, norepinefrina, dopamina, histamina, β -feniletilamina, N-acetilputrescina, triptamina, n-octilamina, n-pentilamina, quinuramina, 3-metoxitiramina, y n-decilamina. Especialmente preferida es la composición que contiene tiramina o bencilamina. La amina también puede estar en forma de sal de un ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable, conocido en la técnica.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al tratamiento y/o la prevención de la Diabetes mellitus en un mamífero, especialmente en un ser humano, que

comprende la administración de cualquiera de las combinaciones farmacéuticas antes mencionadas. También es parte de la presente invención el uso de una mezcla de un compuesto de vanadio (IV)/(V) farmacéuticamente

5 aceptable, y una amina farmacéuticamente aceptables del grupo de los sustratos de amino oxidasa sensible a semicarbazida, o una de sus sales, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la Diabetes mellitus.

10

Los Ejemplos 1-4 ilustran que las combinaciones de la presente invención son imitadoras de la insulina. Así, la combinación de vanadato y tiramina estimula el transporte de glucosa (Ejemplo 1) y la translocación de

15

transportadores de glucosa (Ejemplo 2), de la misma manera que lo hace la insulina. De forma similar, la combinación de vanadato y bencilamina estimula el transporte de glucosa (Ejemplo 3) y la translocación de transportadores de glucosa (Ejemplo 4), de la misma

20

manera que lo hace la insulina. El Ejemplo 5 ilustra que las actividades antes mencionadas no están limitadas a la tiramina o a la bencilamina; de hecho, es una propiedad general de las aminas que son sustratos de la amino oxidasa sensible a semicarbazida.

25

Para el propósito de la presente invención, resulta crucial que las concentraciones eficaces de vanadato en las combinaciones imitadoras de insulina, son un orden de magnitud menores que las concentraciones necesarias para

30

imitar la acción de la insulina cuando se usa vanadato solo. Esto significa que hay una sinergia entre el compuesto de vanadio y la amina. Desde el punto de vista práctico, esta sinergia significa que, para un efecto imitador de insulina dado, la toxicidad del medicamento

35

basado en una combinación vanadio+amina es mucho menor que la toxicidad de un medicamento basado en vanadio solo. Para el tratamiento y/o la prevención de la

Diabetes mellitus, esto representa una importante ventaja de la combinación farmacéutica de la presente invención respecto a las composiciones de vanadio conocidas en la técnica.

5

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variaciones, tales como "comprendiendo", no pretenden excluir otros aditivos, componentes, elementos o pasos. Las descripciones en el
10 resumen que acompaña a esta solicitud y en la solicitud de la cual se reivindica prioridad, se incorporan aquí como referencia. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En parte, los resultados se muestran gráficamente en las siguientes figuras:

20

La Figura 1 es una ilustración gráfica de la variación de los valores de transporte de glucosa (expresados como porcentaje de los valores máximos, E) en adipocitos aislados, en respuesta a la incubación durante 45 min
25 en presencia de diferentes concentraciones (expresadas como logaritmo de la concentración molar, $\log [M]$) de insulina (triángulos negros), peróxido de hidrógeno (círculos negros) y tres sustratos de amino oxidasa sensible a semicarbazida (tiramina, rombos blancos;
30 serotonina, cuadrados blancos; fenilefrina, círculos blancos).

La Figura 2 es una ilustración gráfica de la variación de los valores de transporte de glucosa (expresados como
35 concentración C de 2-desoxiglucosa en nanomoles, captados durante cinco minutos, por 100 mg de lípido) en adipocitos aislados de rata, en respuesta a la incubación

durante 45 min en las siguientes condiciones: A, basal; B, insulina 0,1 μ M; C, peróxido de hidrógeno, 1,0 mM; D, tiramina 1,0 mM. Las barras rayadas corresponden a la incubación en presencia de ortovanadato sódico 0,1 mM.

- 5 Las barras claras corresponden a la incubación control. Los números de observaciones se muestran entre paréntesis.

La Figura 3 es una ilustración gráfica de la variación de los valores de transporte de glucosa (expresados como concentración C de 2-desoxiglucosa en nanomoles, captados durante diez minutos, por 100 mg de lípido) en adipocitos aislados de rata, en respuesta a la incubación durante 45 min en presencia de diferentes agentes: (a) insulina 0,1 μ M; (b) bencilamina 0,1 mM; (c) ortovanadato sódico 0,1 mM; (d) semicarbazida 1,0 mM. Cada barra corresponde a un conjunto diferente de condiciones; un signo más indica la presencia del agente correspondiente, y un signo menos, su ausencia.

La Figura 4 es una ilustración gráfica de la variación de los valores de transporte de glucosa (expresados como porcentaje E del efecto máximo de la insulina) en adipocitos aislados de rata, en respuesta a la incubación durante 45 min en presencia de diferentes condiciones y diferentes aminos. (A)/(B) corresponde respectivamente a incubaciones realizadas en ausencia/presencia de vanadato sódico 0,1 mM. Las barras oscuras/claras corresponden a incubaciones realizadas en presencia de aminos en concentraciones 1,0 mM/0,1 mM. Cada letra minúscula corresponde a la incubación en presencia de una amina distinta, como sigue: (a) desoxiepinefrina (b) epinefrina; (c) dopamina; (d) norepinefrina; (e) tiramina; (f) histamina; (g) β -feniletilamina; (h) N-acetilputrescina; (i) triptamina; (j) n-octilamina; (k) n-pentilamina; (l) quinuramina; (m) 3-metoxitiramina; (n) bencilamina y (o) n-decilamina.

La Figura 5 es una ilustración gráfica de la variación de la glicemia (G, expresada en mg/dl) frente al día de tratamiento (d). Los círculos blancos corresponden a ratas diabéticas tratadas con una inyección i.p. diaria de vanadato (50 $\mu\text{mol/kg}$) solo; los cuadrados blancos, a ratas tratadas además con bencilamina administrada por minibombas osmóticas (84 $\mu\text{mol/kg/día}$). Como control (rombos negros) sirvieron las ratas diabéticas sometidas a una operación simulada, que recibieron una inyección diaria del vehículo. Los valores son medias \pm ESM de 4-12 observaciones.

Las Figuras 6 y 7 son ilustraciones gráficas de la variación de la glicemia (G, expresada en mg/dl) frente al día de tratamiento (d), para ratas inyectadas i.p. diariamente con vanadato a 25 $\mu\text{mol}/(\text{kg de peso corporal})$ durante la primera semana y con 50 $\mu\text{mol}/(\text{kg de peso corporal})$ durante la segunda semana. Los triángulos blancos corresponden a ratas diabéticas tratadas con bencilamina; los círculos blancos, a ratas diabéticas tratadas con vanadato; los cuadrados blancos, a ratas diabéticas tratadas con bencilamina y vanadato. Los valores son medias \pm ESM de 3-6 observaciones por grupo.

EJEMPLOS

0. Métodos Generales

Aislamiento de adipocitos. Se sacrificaron ratas Wistar macho (200-260 g) alimentadas, y se disecaron y digirieron los tejidos adiposos epididimales en tampón Krebs-Ringer, tal y como se ha descrito (cf. C. Carpenne y col., Biochem. Pharmacol. 1990, vol. 40, pp. 437-445). Una vez las células adiposas fueron aisladas, éstas fueron utilizadas en estudios subsiguientes.

Determinación de la actividad amino oxidasa. La actividad amino oxidasa se determinó tal y como se ha descrito (cf. P.H. Yu, "Monoamine oxidase", en A.A. Boulton y col. eds., "Neuromethods, Neurotransmitter Enzymes", 1986, vol. 5, pp. 235-272, Humana Press, Clifton, NJ, USA), utilizando [14 C]tiramina o [14 C]bencilamina como sustratos.

Transporte de hexosas. Después de un período de preincubación de 45 min a 37 °C en viales conteniendo 400 µl de suspensión celular en tampón Krebs-Ringer-bicarbonato con los productos objeto de estudio, se añadió [3 H]-2-desoxiglucosa a una concentración final de 0,1 mM (approx. 1.300.000 d.p.m./vial). Los viales así constituidos se incubaron durante 5 o 10 min y luego se paró el ensayo de captación mediante la adición de 100 µl de citocalasina B. A continuación, se centrifugaron alícuotas (200 µl) de suspensión celular en microtubos, tal y como se ha descrito (cf. J.M. Olefsky, Biochem. J. 1978, vol. 172, pp. 137-145). Tras la centrifugación, se recogieron las células adiposas (la parte superior de los tubos) en viales de centelleo y se llevó a cabo el conteo de la radiactividad. La 2-desoxiglucosa (2-DG) extracelular presente en la fracción celular se determinó en adipocitos cuya actividad de transporte había sido previamente anulada mediante la adición de citocalasina B, y este valor no excedió del 1% de la captación de 2-DG máxima en presencia de insulina.

Ejemplo 1: Efecto potenciador del ortovanadato y de la tiramina sobre la captación de 2-desoxiglucosa

Se determinó si la oxidación de aminas podía imitar la acción de la insulina sobre el transporte de glucosa a través de la generación de peróxido de hidrógeno. Se comprobó que el transporte de glucosa no era activado tras la preincubación de adipocitos durante 45 min en

presencia de concentraciones crecientes de tiramina, serotonina o fenilefrina, mientras que, en las mismas condiciones (5 min de captación de 2-DG), la insulina estimulaba doce veces el transporte de glucosa (Figura 1). Sin embargo, la adición exógena de H_2O_2 aumentó el transporte de hexosas de manera dependiente de concentración (círculos negros en Figura 1). Así, la incubación durante 45 min con H_2O_2 1 mM aumentó el transporte un factor de 5.0 ± 0.8 veces, un efecto equivalente al 46 % del efecto máximo de la insulina ($n = 23$).

La Figura 2 muestra que el ortovanadato potencia el efecto de la tiramina así como del peróxido de hidrógeno. El ortovanadato a concentraciones de 0,1 mM no afectó el transporte de glucosa en estado basal o en presencia de insulina, mientras que, cuando se combinó con 1 mM peróxido de hidrógeno, provocó una activación sustancial, equivalente a tres cuartas partes del efecto máximo de la insulina.

La estimulación del transporte de glucosa inducida por la combinación de tiramina 1 mM más vanadato 0,1 mM apareció en un elevado número de observaciones ($n = 40$), y el grado de estimulación alcanzó un 54 ± 5 % comparado con el efecto de la insulina (la combinación de ortovanadato e insulina dió lugar a la estimulación del transporte de glucosa similar a la inducida por insulina: 102 ± 3 %, $n = 40$). Además, no se observó sinergia entre la tiramina y bajas concentraciones de insulina (10 pM) o peróxido de hidrógeno (0.01 mM) (no mostrado).

Concentraciones de semicarbazida del orden de 0,1 mM inhibieron un 59 ± 7 % la actividad de transporte de glucosa promovida por la combinación de tiramina 1 mM más ortovanadato. El transporte de glucosa estimulado por peróxido de hidrógeno 1 mM más ortovanadato 0,1 mM no se afectó en presencia de semicarbazida 1 mM.

Ejemplo 2: Translocación de GLUT4 inducida por tiramina más ortovanadato.

5 Para verificar si la estimulación del transporte de glucosa en adipocitos de rata se explicaba por la translocación de transportadores de glucosa sensibles a la insulina desde un locus intracelular a la membrana plasmática, en paralelo a lo descrito para la insulina,
10 se determinó la abundancia de la proteína GLUT4 en fracciones de membrana plasmática (PM) y microsomas de baja densidad (LDM). Análisis de "Western" mostró que, en condiciones en las cuales la insulina aumentó la abundancia de proteína GLUT4 en la fracción PM un $252 \pm$
15 43% ($n = 3$), la combinación de tiramina más ortovanadato aumentó un $163 \pm 9 \%$ (aproximadamente la mitad del efecto de la insulina), mientras que el ortovanadato a concentraciones de $0,1 \text{ mM}$ por sí mismo no presentó ningún efecto ($103 \pm 8 \%$). El incremento en la abundancia de
20 GLUT4 tuvo lugar sin cambios significativos en el contenido de β -integrina, una proteína constitutiva de la membrana plasmática. Los cambios en el contenido de GLUT4 en las fracciones LDM fueron inversos a los observados en el caso de PM (el contenido de GLUT4 en LDM disminuyó un
25 29% y un 12% , tras la incubación con insulina o la combinación de tiramina más ortovanadato, respectivamente).

Ejemplo 3: Estimulación sinérgica del transporte de glucosa por bencilamina y ortovanadato en adipocitos aislados de rata

El efecto de la bencilamina, un sustrato preferente de la amino oxidasa sensible a semicarbazida (SSAO), sobre la
35 captación de 2-desoxiglucosa en adipocitos aislados de rata, se muestra en la Figura 3. Los resultados indican que, en estas condiciones, no apareció efecto estimulador

de bencilamina (100 μ M). Sin embargo, la combinación de bencilamina (100 μ M) y concentraciones muy bajas de ortovanadato (100 μ M), las cuales por sí mismas no estimulaban la captación de 2-desoxiglucosa, provocó
5 aproximadamente la estimulación de 6 veces en el transporte de glucosa. Además, la captación de 2-desoxiglucosa estimulada por bencilamina-ortovanadato fue dependiente de la actividad SSAO; así, la incubación en presencia de semicarbazida (1 mM), el inhibidor
10 específico de la actividad SSAO bloqueó la estimulación de la captación de 2-desoxiglucosa por bencilamina y ortovanadato.

Ejemplo 4: Reclutamiento de transportadores de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática en adipocitos, inducido por bencilamina y ortovanadato.

Este estudio fue realizado con el objeto de determinar si la estimulación del transporte de glucosa inducido por la
20 combinación de bencilamina y ortovanadato era consecuencia de alteraciones en la abundancia de los transportadores de glucosa GLUT4 presente en la membrana plasmática de células adiposas. Así, adipocitos aislados de rata fueron incubados en ausencia o en presencia de
25 insulina, bencilamina (100 μ M), ortovanadato (100 μ M) o la combinación de bencilamina y ortovanadato, y 45 min más tarde, las células fueron homogenizadas y sometidas a fraccionamiento subcelular de membranas. Se observó que
30 el tratamiento con insulina provoca un incremento de 3.3 veces en la abundancia de GLUT4 en preparaciones de membrana plasmática y que, en esas condiciones, la incubación de las células con bencilamina u ortovanadato por separado, no alteró la abundancia de GLUT4 en
35 membranas plasmáticas. Sin embargo, la incubación de células con bencilamina y ortovanadato causó un incremento de 2.3 veces en la presencia de GLUT4 en fracciones de membrana plasmática. Los efectos de la

insulina o de la combinación de bencilamina y ortovanadato sobre la abundancia de GLUT4 en membrana plasmática fueron específicos y el marcador de membrana plasmática β 1-integrina permaneció constante tras la incubación con los distintos agentes. El reclutamiento de GLUT4 a la membrana plasmática inducida por insulina o la combinación de bencilamina y ortovanadato fue concomitante con una reducción en la abundancia de GLUT4 en membranas intracelulares. Esto es consistente con la idea de que la combinación de bencilamina y ortovanadato translocan GLUT4 a la membrana plasmática en adipocitos aislados de rata.

Ejemplo 5: Actividad de otros sustratos de amino oxidasa sensible a semicarbazida

La Figura 4 muestra los efectos estimuladores de diferentes sustratos de amino oxidasa sensible a semicarbazida (SSAO) sobre el transporte de glucosa en adipocitos aislados de rata. Se observa que quince aminas primarias distintas que son sustratos de amino oxidasa sensible a semicarbazida, muestran una estimulación sinérgica del transporte de glucosa en presencia de 0,1 mM ortovanadato. Ello indica que el efecto estimulador del transporte de glucosa es general para este tipo de sustratos.

Ejemplo 6: La administración crónica de bencilamina y vanadato reduce la hiperglicemia en ratas diabéticas.

A partir del descubrimiento de los potentes efectos insulino-miméticos de la incubación in vitro con bencilamina y vanadato, se ensayó la administración crónica de estos compuestos en ratas diabéticas. Para ello, a ratas con diabetes inducida mediante estreptozotocina se les implantó subcutáneamente una minibomba osmótica que liberaba bencilamina (84

$\mu\text{mol/kg/día}$), o bien se les simuló la operación. Estudios preliminares indicaron que la bencilamina era estable durante dos semanas en las minibombas osmóticas implantadas, en base a su capacidad para continuar
5 estimulando el transporte de glucosa en adipocitos aislados después de ese periodo de tiempo. A un grupo de animales se les sometió también a una inyección i.p. diaria de vanadato ($50 \mu\text{mol/kg}$ de peso corporal) a lo largo de dos semanas. Mientras que el tratamiento con
10 vanadato causó una reducción moderada de la glicemia, la combinación de bencilamina y vanadato normalizó la glicemia tras una semana de tratamiento (ver Figura 5). Los valores de la combinación vanadato-bencilamina (marcados con *) fueron significativamente distintos de
15 los de la operación simulada y de los de vanadato solo, a partir del día 6, para una $P < 0.05$. Además, la administración de bencilamina más vanadato durante dos semanas no alteró la actividad SSAO en los extractos de células adiposas.

20

En otros estudios, a las ratas se les inyectó intraperitonealmente $25 \mu\text{mol/kg}$ de vanadato durante la primera semana, y $50 \mu\text{mol/kg}$ durante la segunda semana. Estas ratas, así como las ratas diabéticas tratadas con
25 $84 \mu\text{mol/kg}$ de bencilamina sola, se mantuvieron hiperglicémicas (ver Figura 6). Sin embargo, la combinación de bencilamina y vanadato redujo la hiperglicemia en las ratas diabéticas durante la segunda semana del tratamiento (ver Figura 7). Los valores de la
30 combinación vanadato-bencilamina (marcados con *) fueron significativamente distintos, comparados con los de vanadato, a partir del día 5, a una $P < 0.05$.

El tratamiento crónico con bencilamina y vanadato causó
35 un descenso sustancial en el consumo de alimento y agua, el cual volvió a niveles normales, y un aumento en el peso del tejido adiposo del epidídimo. Todas estas

variaciones se dieron en ausencia de cambios en el peso corporal. Los efectos sobre la adiposidad de la ingesta de alimento y agua no se detectaron cuando la bencilamina o el vanadato se administraron solos. Además, la

5 normalización de la glicemia causada por el tratamiento crónico con bencilamina y vanadato se da en ausencia de cambios en las concentraciones de insulina en plasma.

10

15

20

25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Combinación antidiabética para administración simultánea, separada o secuencial, caracterizada porque
5 incluye un compuesto de vanadio (IV)/(V) farmacéuticamente aceptable y una amina farmacéuticamente aceptable, seleccionada del grupo formado por sustratos de la amino oxidasa sensible a semicarbazida, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicha amina, mezclados con
10 excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
2. Combinación según la reivindicación 1, donde el compuesto de vanadio se selecciona del grupo formado por vanadatos, complejos de peroxovanadio, sales de vanadilo
15 y complejos de vanadilo.
3. Combinación según la reivindicación 2, donde el compuesto de vanadio se selecciona del grupo de vanadatos.
20
4. Combinación según la reivindicación 3, donde el compuesto de vanadio es ortovanadato sódico.
5. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones
25 1-4, donde la amina se selecciona del grupo formado por tiramina, bencilamina, desoxiepinefrina, epinefrina, norepinefrina, dopamina, histamina, β -feniletilamina, N-acetilputrescina, triptamina, n-octilamina, n-pentilamina, quinuramina, 3-metoxitiramina, y
30 n-decilamina.
6. Combinación según la reivindicación 5, donde la amina es tiramina.
- 35 7. Combinación según la reivindicación 5, donde la amina es bencilamina.

8. Uso de un compuesto de vanadio (IV)/(V) farmacéuticamente aceptable y una amina farmacéuticamente aceptable, seleccionada del grupo formado por sustratos de la amino oxidasa sensible a semicarbazida, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicha amina, para la
5 preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la Diabetes mellitus, mediante administración simultánea, separada o secuencial.
- 10 9. Uso según la reivindicación 8, donde el compuesto de vanadio se selecciona del grupo formado por vanadatos, complejos de peroxovanadio, sales de vanadilo y complejos de vanadilo.
- 15 10. Uso según la reivindicación 9, donde el compuesto de vanadio se selecciona del grupo de vanadatos.
11. Uso según la reivindicación 10, donde el compuesto de vanadio es ortovanadato sódico.
- 20 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde la amina se selecciona del grupo formado por tiramina, bencilamina, desoxiepinefrina, epinefrina, norepinefrina, dopamina, histamina, β -feniletilamina, N-acetilputrescina, tryptamina, n-octilamina,
25 n-pentilamina, quinuramina, 3-metoxitiramina, y n-decilamina.
13. Uso según la reivindicación 12, donde la amina es
30 tiramina.
14. Uso según la reivindicación 12, donde la amina es bencilamina.
- 35 15. Producto caracterizado por contener un compuesto de vanadio (IV)/(V) farmacéuticamente aceptable y una amina farmacéuticamente aceptable, seleccionada del grupo de

sustratos de la amino oxidasa sensible a semicarbazida, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicha amina, como preparación combinada para su administración simultánea, separada o secuencial, para el tratamiento y/o la
5 prevención de la Diabetes mellitus.

16. Producto según la reivindicación 15, donde el compuesto de vanadio se selecciona del grupo formado por vanadatos, complejos de peroxovanadio, sales de vanadilo
10 y complejos de vanadilo.

17. Producto según la reivindicación 16, donde el compuesto de vanadio se selecciona del grupo de vanadatos.
15

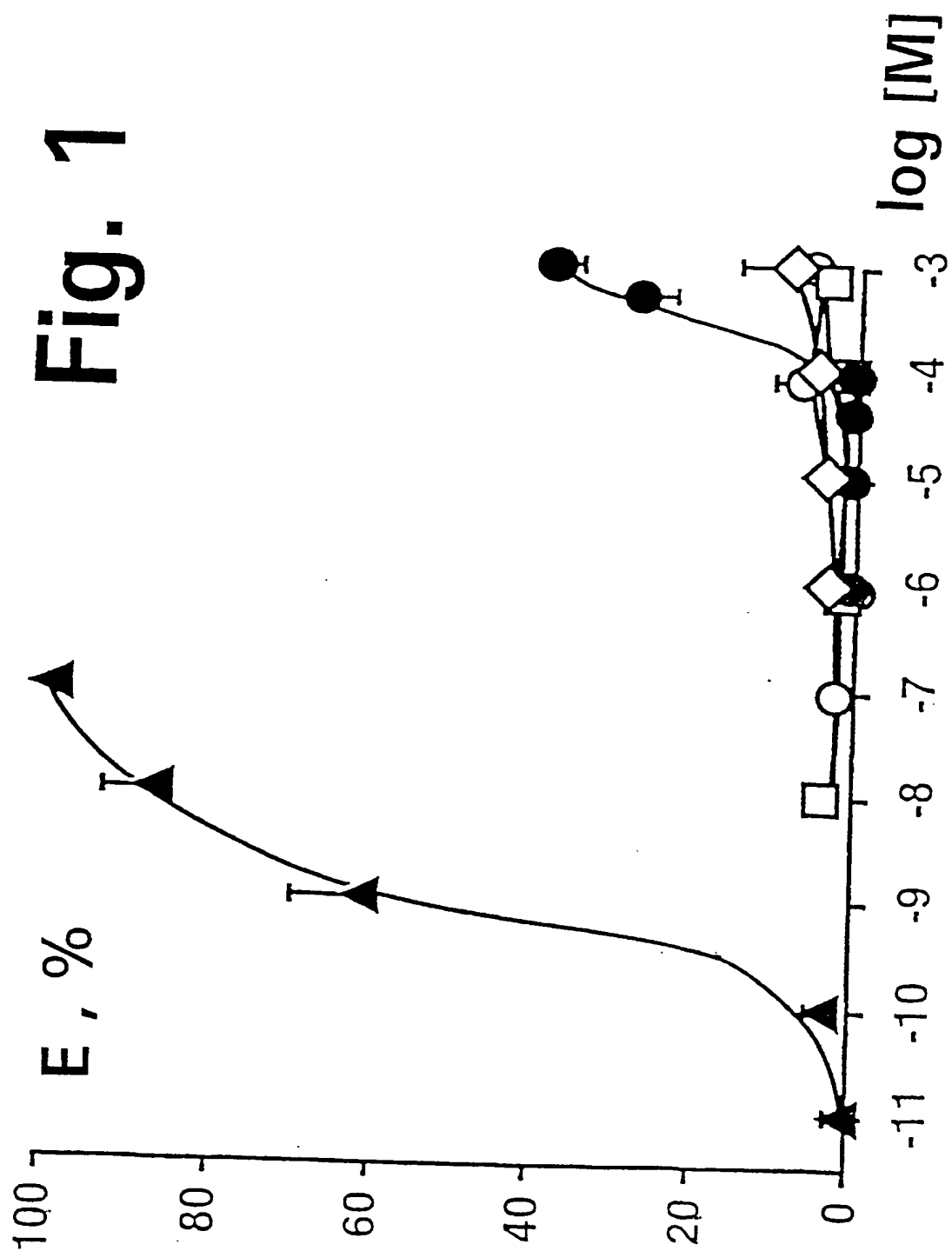
18. Producto según la reivindicación 17, donde el compuesto de vanadio es ortovanadato sódico.

19. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 15-
20 18, donde la amina se selecciona del grupo formado por tiramina, bencilamina, deoxiepinefrina, epinefrina, norepinefrina, dopamina, histamina, β -feniletilamina, N-acetilputrescina, triptamina, n-octilamina, n-pentilamina, quinuramina, 3-metoxitiramina, y
25 n-decilamina.

20. Producto según la reivindicación 19, donde la amina es tiramina.

30 21. Producto según la reivindicación 19, donde la amina es bencilamina.

1/7



2/7

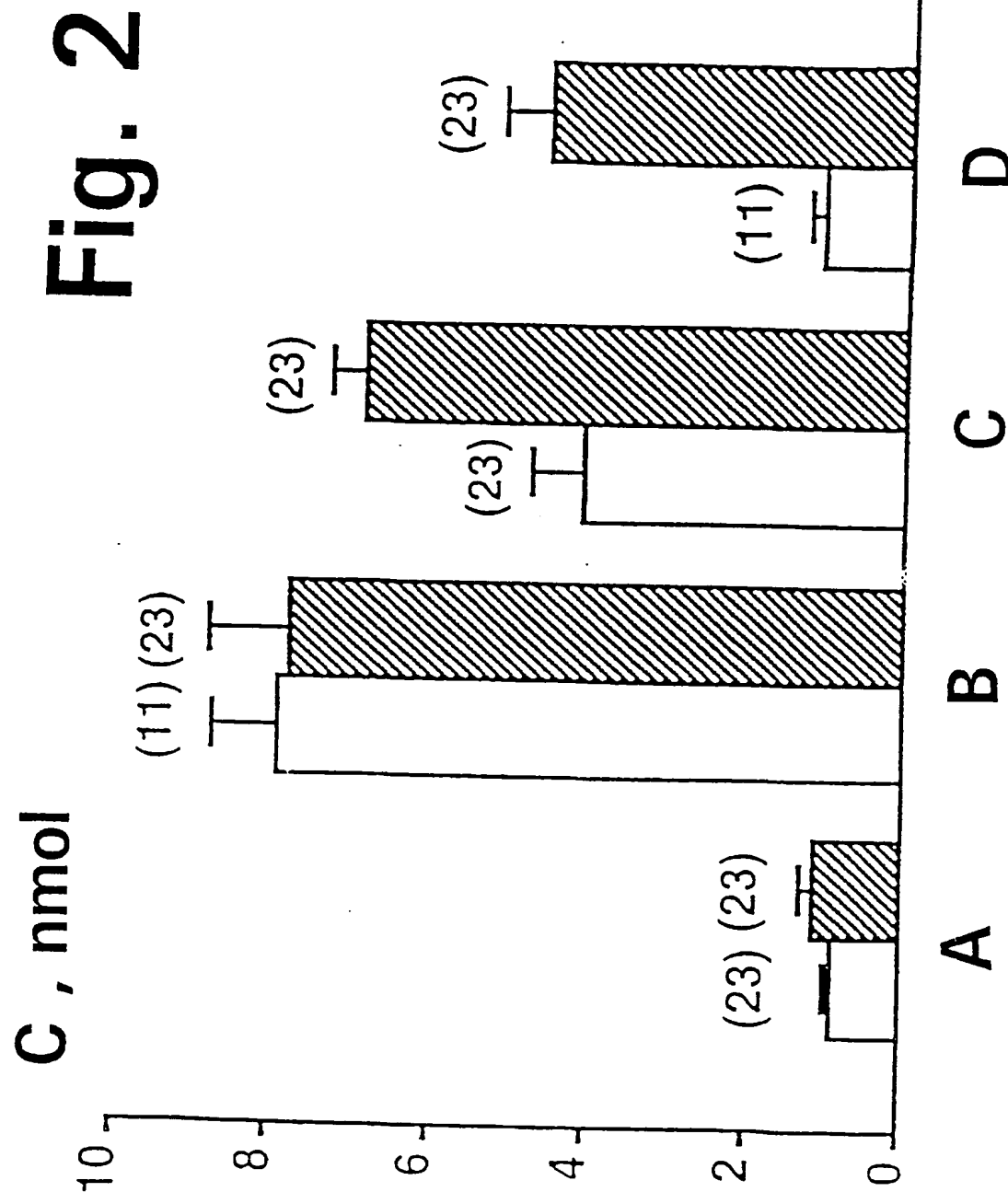
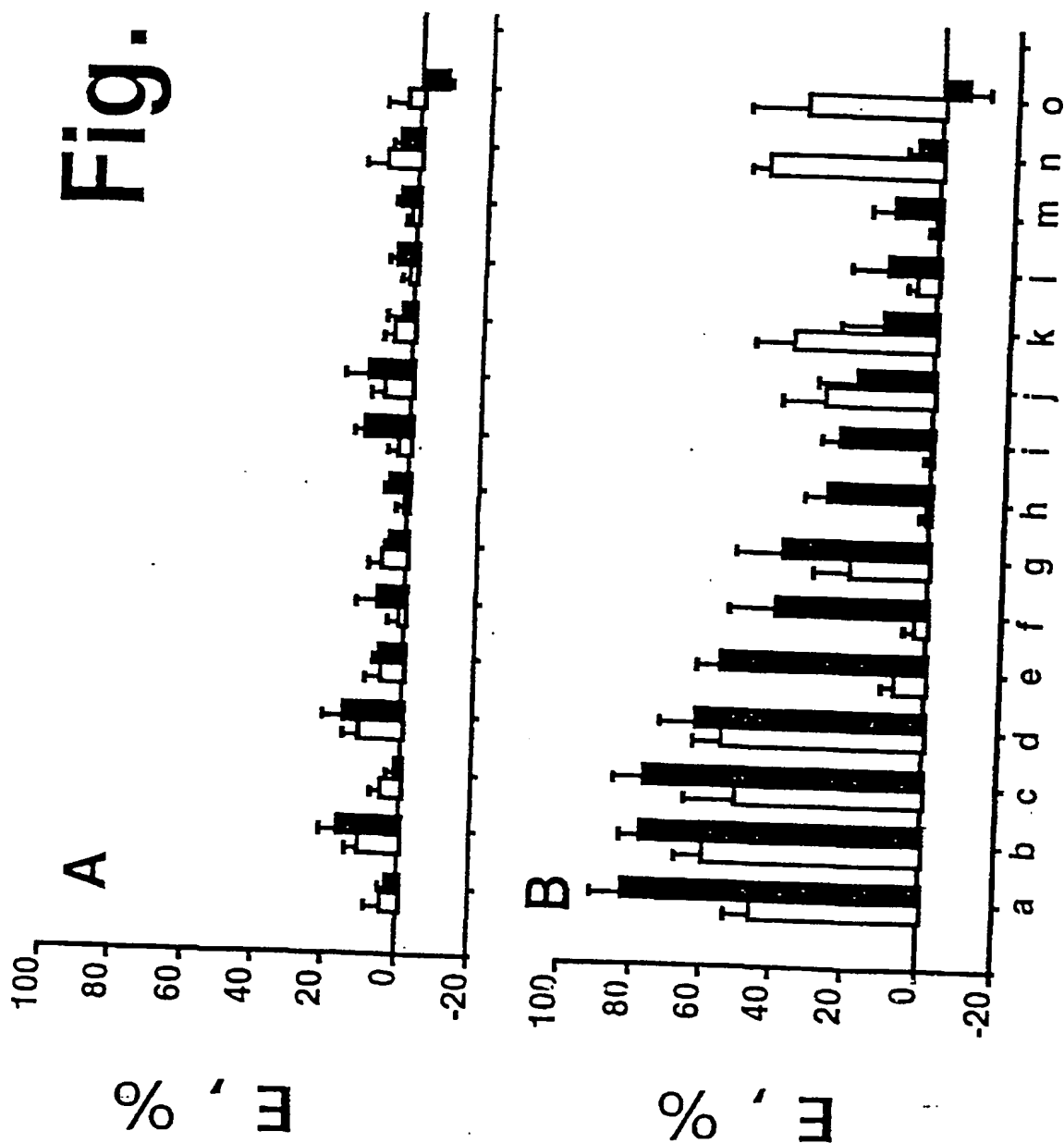
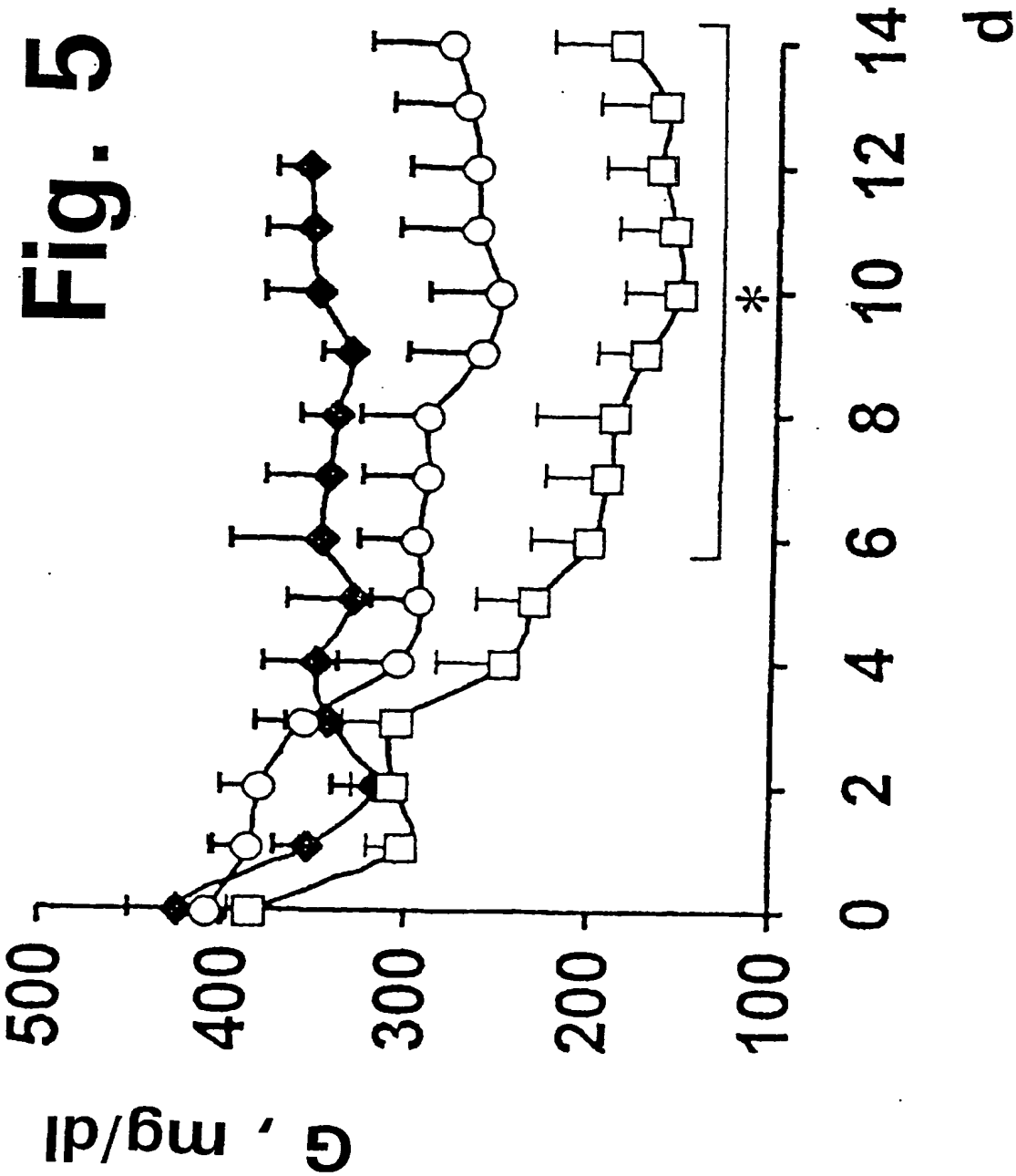
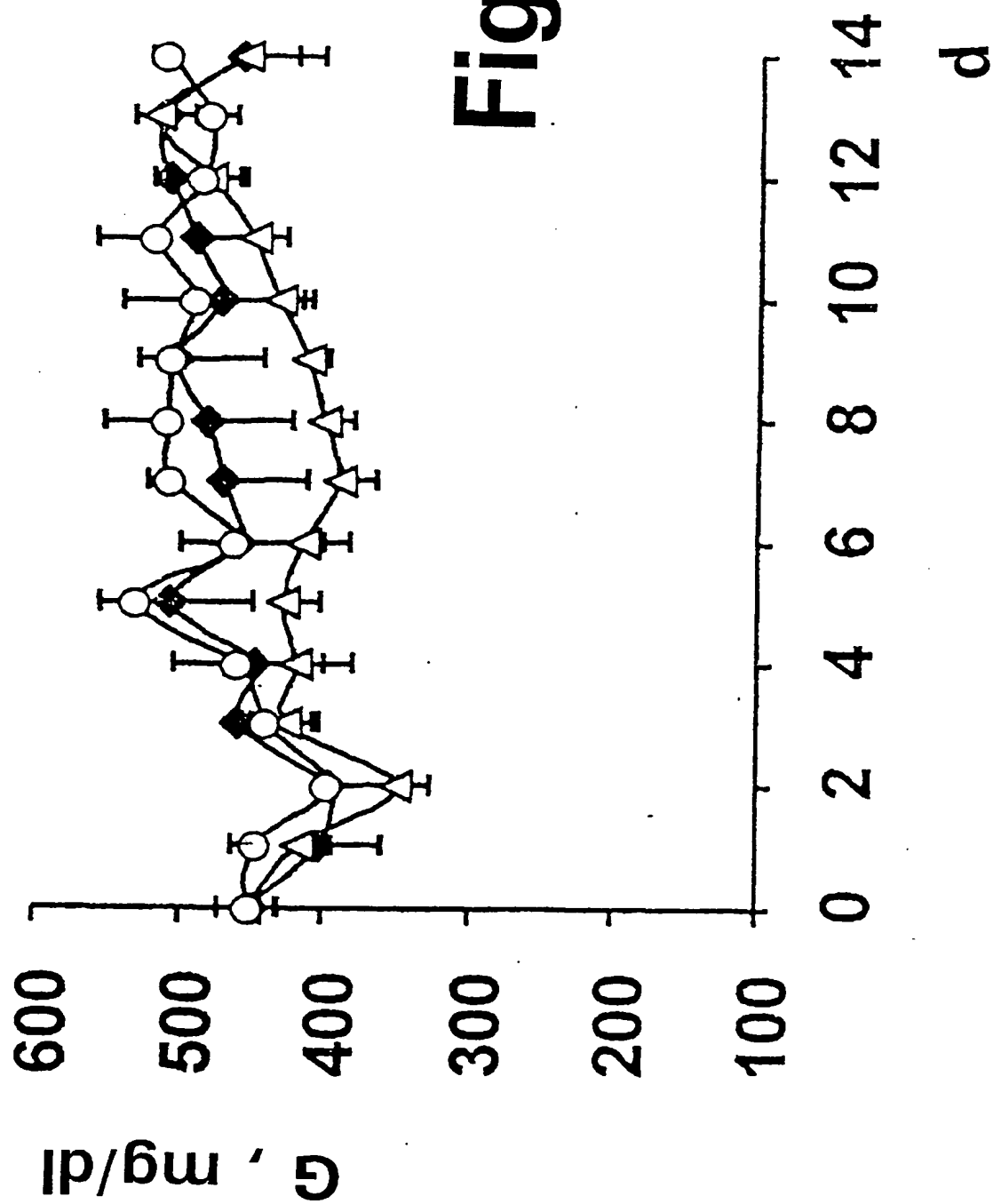


Fig. 4

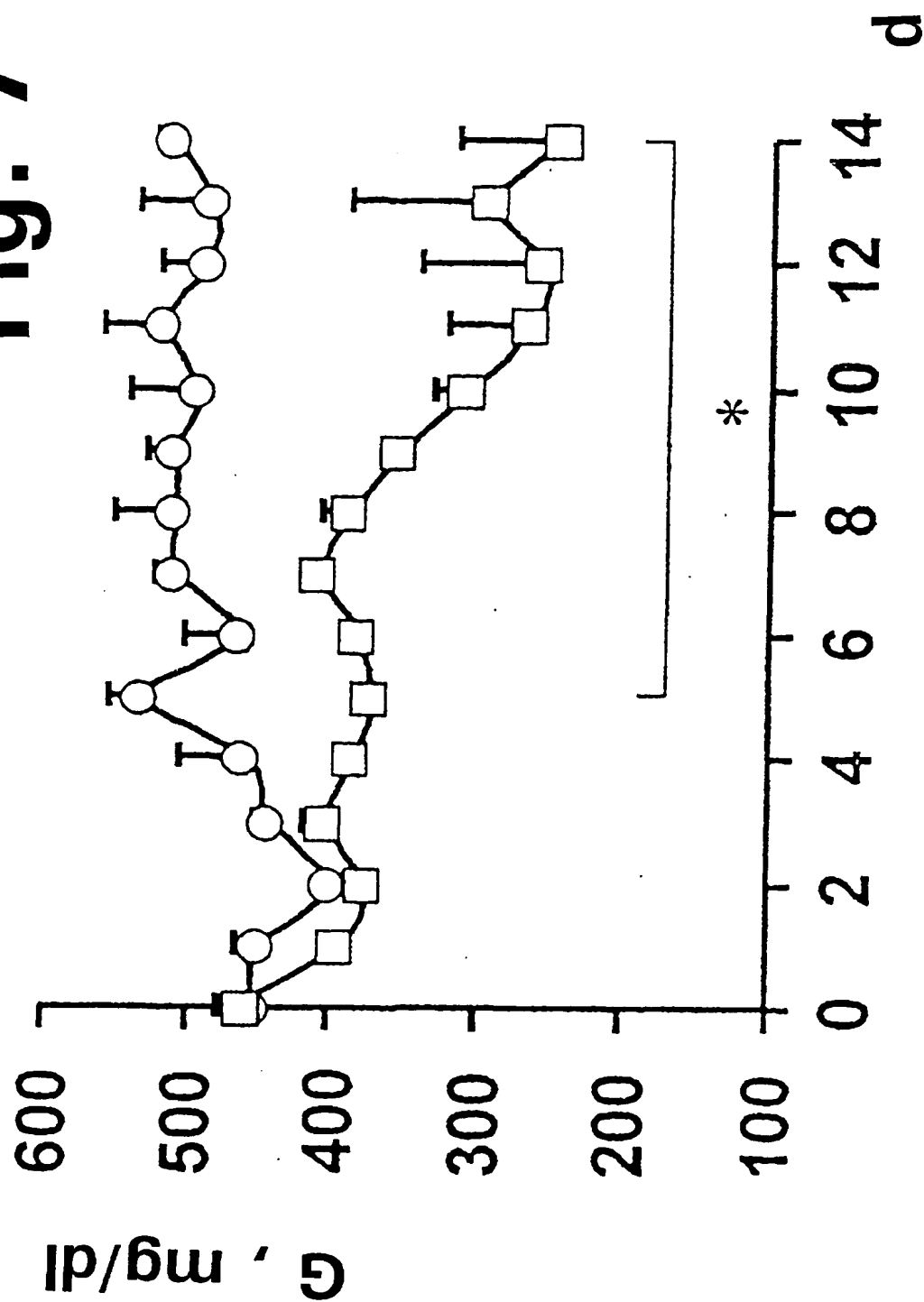




6/7



7/7

Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 01/00424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7: A61K 31/28, A61K 31/13, A61P 3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7: A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

LA, BIOSIS, EPODOC, CIBEPAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MARTI, LUC and col. Combined treatment with benzylamine and low dosages of vanadate enhances glucose tolerance and reduces hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats Diabetes. Septembre 2001, Volume 50, N° 9, pages 2061-2068	1-21
X	ENRIQUE - TARANCÓN, G. and col. Substrates of semicarbazide- sensitive amine oxidase co-operate with vanadate to stimulate tyrosine phosphorylation of insulin-receptor-substrate proteins, phosphoinositide 3-kinase activity and GLUT 4 translocation in adipose cells. Biochemical Journal, 15 August 2000, Volume 35, pages 171-180. Introduction Septembre 2001, Volume, pages	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 JANUARY 2002 (24.01.02)

Date of mailing of the international search report

14 FEBRUARY 2002 (14.02.02)

Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 01/00424

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARTI, LUC and col. Tyramine and Vanadate Synergistically Stimulate Glucose Transport in Rat Adipocytes by Amine Oxidase- Dependent Generation of Hydrogen Peroxide 1. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1998, Volume 285, N° 1, pages 342-349. the abstract,	1-21
P,X	CARPENE, C. and col. Substrates of semicarbazide- sensitive amine oxidase mimic diverse insulin effects in adipocytes Inflammation Research. April 2001, Volume 50, Supp. 2 pages 5142-5143.	1-21
X	ENRIQUE -TARANCON, G and col. Role of Semicarbazide-sensitive Amine Oxidase on glucose transport and GLUT 4 recruitment to the Cell Surface in Adipose Cells. The Journal of Biological Chemistry. 1998, Volume 273, N° 4, pages 8025-8032. Introduction	1-21
A	FR 2686511 A (SOCIÉTÉ EN NOM COLLECTIF) 30.07.1993, the abstract,	1
A	EP 264278 A (POSNER, BARRY I.) 20.04.1988 the abstract	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 01/00424

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2686511 A	30.07.1993	WO 9314772 A EP 624092 A	05.08.1993 17.11.1993
EP 264278 A	20.04.1988	DE 3775331D D AT 70450T T GR 3003402T T US 5069913 A US 4882171 A CA 1277599 A AU 7979387 A AU 602927 B JP 63179828 A	30.01.1992 15.01.1992 17.02.1993 03.12.1991 21.11.1989 11.12.1990 21.04.1988 01.11.1990 23.07.1988

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 01/00424

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUDCIP⁷ A61K 31/28, A61K 31/13, A61P 3/10

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

LA, BIOSIS, EPODOC, CIBEPAT

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
P,X	MARTI, LUC y col. Combined treatment with benzylamine and low dosages of vanadate enhances glucose tolerance and reduces hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats Diabetes. Septiembre 2001, Volumen 50, N° 9, páginas 2061-2068	1-21
X	ENRIQUE - TARANCÓN, G. y col. Substrates of semicarbazide- sensitive amine oxidase co-operate with vanadate to stimulate tyrosine phosphorylation of insulin-receptor-substrate proteins, phosphoinositide 3-kinase activity and GLUT 4 translocation in adipose cells. Biochemical Journal, 15 Agosto 2000, Volumen 35, páginas 171-180. Introduction	1-21

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 24 enero 2002 (24.01.2002)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

14 FEB 2002

14. 02. 02

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304Funcionario autorizado
E. ALBARRÁN

n° de teléfono +34 91 3495595

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 01/00424

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	MARTI, LUC y col. Tyramine and Vanadate Synergistically Stimulate Glucose Transport in Rat Adipocytes by Amine Oxidase- Dependent Generation of Hydrogen Peroxide 1. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1998, Volumen 285, Nº 1, páginas 342-349. Resumen	1-21
P,X	CARPENE, C. y col. Substrates of semicarbazide- sensitive amine oxidase mimic diverse insulin effects in adipocytes Inflammation Research. Abril 2001, Volumen 50, Supp. 2 páginas 5142-5143.	1-21
X	ENRIQUE -TARANCON, G y col. Role of Semicarbazide-sensitive Amine Oxidase on glucose transport and GLUT 4 recruitment to the Cell Surface in Adipose Cells. The Journal of Biological Chemistry. 1998, Volumen 273, Nº 4, páginas 8025-8032. Introducción	1-21
A	FR 2686511 A (SOCIÉTÉ EN NOM COLLECTIF) 30.07.1993, resumen	1
A	EP 264278 A (POSNER, BARRY I.) 20.04.1988 resumen	1

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
 Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES 01/00424

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
FR 2686511 A	30.07.1993	WO 9314772 A EP 624092 A	05.08.1993 17.11.1993
EP 264278 A	20.04.1988	DE 3775331D D AT 70450T T GR 3003402T T US 5069913 A US 4882171 A CA 1277599 A AU 7979387 A AU 602927 B JP 63179828 A	30.01.1992 15.01.1992 17.02.1993 03.12.1991 21.11.1989 11.12.1990 21.04.1988 01.11.1990 23.07.1988